ความหลากหลายทางชีวภาพและศักยภาพในการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินในอุทยานประวัติศาสตร์พนมรุ้ง จังหวัดบุรีรัมย์

Biodiversity and Potential for Producing Biological Substances of Actinomycetes Isolated from Soil in Phanom Rung Historical Park, Buriram Province

สุจิตกัลยา มฤครัฐอินแปลง[1*] และ สัญญา กุดั่น[2]

Sujidkanlaya Maruekarajtinplaeng[1*] and Sanya Kudan[2]

[1]สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

[1]Microbiology Program, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University

[2]Department of Biotechnology, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University

*E-mail: sujidkanlaya@gmail.com

Received: Nov 10, 2023

Revised: Jan 15, 2024

Accepted: Jan 17, 2024

บทคัดย่อ

แอคติโนมัยสีทเป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติโดดเด่นด้านการผลิตสารชีวภาพที่มีคุณสมบัติหลากหลาย เช่น สารสี สารต้านจุลชีพ และสารต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อแยก คัดเลือก และศึกษาความสามารถในการผลิตสารชีวภาพบางชนิดของแอคติโนมัยสีทจากดินของอุทยานประวัติศาสตร์พนมรุ้ง จังหวัดบุรีรัมย์ แยกแอคติโนมัยสีทด้วยวิธี spread plate บนอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของแอคติโนมัยสีท ได้แก่ Starch Casein Agar (SCA), International Streptomyces Project 1 (ISP1), Actinomyces Isolation agar (AIA) และ Hickey's Terner agar (HTA) ศึกษาลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง SCA ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ทดสอบความสามารถในการหลั่งสารสีออกนอกเซลล์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว Starch Casein Broth (SCB) ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 527, *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1867, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370, *Bacillus cereus* TISTR 2372 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 746 ด้วยวิธี Agar block method นอกจากนี้ยังศึกษาผลของอุณหภูมิ และแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการผลิตสารสี และสารต้านแบคทีเรียของแอคติโนมัยสีท ผลการศึกษาพบว่าแยกแอคติโนมัยสีทได้ 123 ไอโซเลท จัดกลุ่มเชื้อตามลักษณะสัณฐานวิทยา และตามความสามารถในการผลิตสารต้านแบคทีเรียได้ 8 และ 4 กลุ่ม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิและแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีต่อความสามารถในการผลิตสารสี และสารต้านแบคทีเรียของแอคติโนมัยสีท

คำสำคัญ: แอคติโนมัยสีท ความหลากหลายทางชีวภาพ สารสี สารต้านแบคทีเรีย

Abstract

Actinomycetes are bacteria having the well-known ability to produce biological substances with a variety of properties such as pigments, antimicrobials and antioxidants. This research aimed to isolate, select and study the ability to produce some biological substances of actinomycetes isolated from soil of Phanom Rung Histological Park, Buriram Province. The isolation of actinomycetes was conducted by spread plate technique on media suitable for growth of actinomycetes including Starch Casein Agar (SCA), International Streptomyces Project 1 (ISP1), Actinomyces Isolation agar (AIA) and Hickey's Terner agar (HTA). Colony morphology of the isolated actinomycetes grown on SCA was studied under a stereo microscope. The ability to secret pigments out of the cells was examined in Starch Casein Broth (SCB). Antibacterial ability was tested by using Agar block method

against five species of pathogenic bacteria including *Escherichia coli* TISTR 527, *Klebsiella pneumoniae* TISTR 1867, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 2370, *Bacillus cereus* TISTR 2372 and *Staphylococcus aureus* TISTR 746 by using Agar block method. Furthermore, the effects of temperature and carbon sources in culture media on ability of actinomycetes to produce pigments and antibacterial substances were also investigated. From the results, 123 isolates of actinomycetes were isolated. They were grouped into 8 and 4 groups according to their colony morphologies and ability to produce antibacterial substances, respectively. In addition, temperature and carbon sources in culture media were found to affect ability of actinomycetes to produce pigments and antibacterial substances.

Keywords: Actinomycetes, Biodiversity, Pigment, Antibacterial substance

1. บทนำ

แอคติโนมัยสีท (Actinomycetes) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะของเซลล์คล้ายราคือ สามารถสร้างเส้นใยสั้น ๆ ที่มีทั้งเส้นใยอาหาร (Substrate mycelium) และเส้นใยอากาศ (Aerial mycelium) แต่มีบางจีนัส (Genus) เช่น *Salinospora, Micromonospora* และ *Verrucosispora* สร้างเฉพาะเส้นใยอาหาร คุณสมบัติโดดเด่นของแบคทีเรียในกลุ่มนี้คือ ความสามารถในการผลิตสารชีวภาพที่มีประโยชน์ เช่น สารต้านการเจริญต่อจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา สารสี สารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ [1], [2] นอกจากนี้ยังเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างซับซ้อน ให้เกิดการหมุนเวียนในวัฏจักรสาร [3], [4] จากอดีตจนถึงปัจจุบัน มีการนำผลที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีทที่เพาะเลี้ยงได้ จากแหล่งอาศัยในระบบนิเวศที่มีลักษณะเฉพาะ เช่น ดินตะกอนจากท้องทะเล น้ำทะเล ป่าชายเลน สุสาน ถ้ำ ทะเลทราย โบราณสถาน อุทยานป่าไม้ อุทยานประวัติศาสตร์และดินหรือโคลนจากภูเขาไฟที่ดับแล้ว เป็นต้น [5]-[10] มาประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ มากมายในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตยาปฏิชีวนะเพื่อใช้ในวงการแพทย์

การค้นพบสารปฏิชีวนะจากเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีทมีมาอย่างยาวนานและต่อเนื่อง แรกเริ่มในปี ค.ศ. 1943 ค้นพบยาสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) ที่สามารถรักษาวัณโรคได้ ซึ่งยานี้ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces griseus* [11] ต่อจากนั้นได้ค้นพบยาปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่น นีโอมัยซิน (Neomycin) คลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol) โบโตรมัยซิน (Bottromycin) และไซฟีมัยซิน (Cypemycin) และทั้งนี้พบว่าสารปฏิชีวนะร้อยละ 80 ที่ใช้ในปัจจุบันผลิตมาจากแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยสีท [12]-[14] และยังคงมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อค้นหาแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ (Species) ใหม่จากพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วโลก เช่น ในปีค.ศ. 2015 พบ *Streptomyces* sp. ที่แยกจากตัวอย่างดินถ้ำคาสร์ (Karst) ในประเทศจีน โดยเชื้อมีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะ เซียเคมัยซิน เอ (Xiakemycin A) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มไพราโนแนพโทควิโนน (Pyranonaphthoquinone) มีฤทธิ์ต้านการเจริญต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 [15] ในประเทศไทยมีรายงานการพบแอคติโนมัยสีท กลุ่มหายาก (Rare actinomycetes) และกลุ่มหายากมาก (Very rare actinomycetes) จากตัวอย่างดินของวนอุทยานถ้ำผาเทพ และถ้ำผานางคอย ที่ตั้งอยู่ทางภาคเหนือ โดยเชื้อสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านมะเร็ง และสารต้านการเจริญต่อแบคทีเรียแกรมบวก [16] นอกจากนี้ ยังมีรายงานการพบแอคติโนมัยสีทจากดินป่าชายเลน จังหวัดสตูล ที่สามารถผลิตเอนไซม์ซีเอ็มซีเอส (CMCase) อะวิซีเลส (Avicelase) โปรติเอส (Protease) และไซแลนเนส (Xylanase) โดยมีเชื้อบางไอโซเลท เช่น MGK1, MGK19, MGK59, MGB5, MBG6, MGH1 และ MGH2 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งก่อโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ยับยั้งรา *Fusarium oxysporum* ซึ่งก่อโรคเหี่ยวในกล้วยไม้ และยับยั้งแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในข้าว [7] อย่างไรก็ตาม ทั่วโลกกำลังเผชิญกับปัญหาการดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่มีใช้ในปัจจุบันของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ต่าง ๆ เช่น เชื้อ *Escherichia coli* ดื้อต่อยาเซฟาโลสปอริน (Cephalosporins) และเพนิซิลลิน (Penicillin) เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ดื้อต่อยา

อะมิคาซิน (Amikacin) และซิโปรฟลอกซาซิน (Ciprofloxacin) เชื้อ *Salmonella typhi* ดื้อต่อยาควิโนโลน (Quinolone) อะมิโนไกลโคไซด์ (Aminoglycoside) คาร์บาเพเนม (Carbapenem) และเซฟาโลสปอริน เชื้อ *Staphylococcus aureus* ดื้อต่อยาเพนิซิลลิน แวนโคมัยซิน (Vancomycin) และเทโคพลานิน (Teicoplanin) เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ดื้อต่อยาเซฟาโลสปอริน และเพนิซิลลิน [17] ทำให้มีความจำเป็นที่ต้องค้นหาเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ เป็นที่ทราบกันในวงวิชาการว่าเชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีท เป็นแหล่งสำคัญของจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ทั้งนี้การศึกษาความหลากหลายของแอคติโนมัยสีท จากแหล่งที่อยู่ที่เฉพาะจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการพบเชื้อสปีชีส์ใหม่ที่ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ด้วย ตัวอย่างของรายงานการวิจัยเกี่ยวกับแอคติโนมัยสีทของไทย ที่มีศักยภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น พบเชื้อ *Streptomyces actinomycinicus* ที่แยกได้จากดินของพื้นที่ป่าในจังหวัดนครราชสีมา ที่สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus epidermidis* TISTR 518, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* TISTR 001 และ *Bacillus cereus* TISTR 687 และสามารถผลิตสารต้านการเจริญต่อแบคทีเรียดื้อยา Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20651 ได้ และยังมีรายงานการพบเชื้อ สปีชีส์ใหม่ *Streptomyces antimicrobicus* sp. nov. จากดินเหนียวนาข้าว จังหวัดชลบุรี ที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและยับยั้งแบคทีเรียดื้อยา เช่น *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae* และ *S. aureus* ได้ นอกจากการเป็นแหล่งผลิตสารปฏิชีวนะที่สำคัญ เชื้อกลุ่มนี้ยังมีศักยภาพด้านการผลิตสารสี ซึ่งมีแนวโน้มสูงด้านการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ ในอนาคต เช่น อุตสาหกรรมหมึกพิมพ์ สีย้อม สีสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร [18] เพื่อแก้ปัญหาการใช้สีจากสารเคมีที่ไม่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

ประเทศไทยเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง แหล่งที่อยู่เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อชนิดของแอคติโนมัยสีท เช่น ในตัวอย่างดินที่เก็บจากป่าชายเลน จังหวัดสตูล พบเชื้อในสกุล *Streptomyces* จำนวน 8 สปีชีส์ ได้แก่ *S. seoulensis, S. scabiei, S. hygroscopicus, S. parvulus, Streptomyces albulus, S. intermedius, S. rameus,* และ *S. levis* และเชื้อสกุล *Micromonospora* 1 สปีชีส์ คือ *M. chokoriensis* [7] ในตัวอย่างดินจากถ้ำบริเวณภาคเหนือของไทย พบแอคติโนมัยสีท 5 สกุล ได้แก่ *Streptomyces*, *Micromonospora, Spirillospora, Catellatospora* และ *Nonomuraea* จากเชื้อตัวแทน 11 ไอโซเลท (Isolate) พบไอโซเลทที่เป็นสปีชีส์ใหม่ถึง 5 ไอโซเลท [16] ซึ่งเป็นข้อมูลที่ช่วยสนับสนุนได้อย่างดีว่าแหล่งระบบนิเวศที่มีลักษณะจำเพาะอาจนำไปสู่การพบแอคติโนมัยสีทสปีชีส์ใหม่ ๆ ได้ ในต่างประเทศมีรายงานการพบแอคติโนมัยสีท สปีชีส์ใหม่ที่มีศักยภาพในการผลิตสารชีวภาพ จากดินภูเขาไฟที่ดับสนิทแล้ว เช่น มนฑลยูนาน (Yunnan) ประเทศจีน [8] และดินโคลนจากภูเขาไฟในหมู่เกาะอันดามัน (Andaman Islands) ประเทศอินเดีย [9] แต่ในประเทศไทยยังคงมีการศึกษาค่อนข้างน้อย อุทยานประวัติศาสตร์พนมรุ้ง จังหวัดบุรีรัมย์ เป็นโบราณสถานที่ตั้งอยู่ในบริเวณที่เคยเป็นภูเขาไฟมาก่อน แต่ปัจจุบันได้ดับสนิทแล้ว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยก คัดเลือก และศึกษาความสามารถในการผลิตสารชีวภาพบางชนิดของแอคติโนมัยสีทจากดินของอุทยานประวัติศาสตร์พนมรุ้ง จังหวัดบุรีรัมย์ รวมทั้งศึกษาผลของอุณหภูมิ และแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการผลิตสารสี และสารต้านแบคทีเรียของแอคติโนมัยสีท

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดิน จาก 6 จุด รอบพื้นที่ปราสาท ให้มีระยะห่างจากองค์ปราสาทด้านละ 1 เมตร โดยด้านทิศเหนือและทิศใต้ ด้านละ 1 จุด ด้านทิศตะวันออกและทิศตะวันตกด้านละ 2 จุด ด้วยการกวาดเศษใบไม้บริเวณผิวหน้าพื้นดินที่จะเก็บตัวอย่างออกให้สะอาด จากนั้นขุดหน้าดิน เป็นรูปตัววี (V-shape) ให้ลึกประมาณ 15 เซ็นติเมตร แล้วเก็บตัวอย่างดินประมาณ 100 กรัม ใส่ถุงเก็บตัวอย่าง เก็บในกล่องเก็บความเย็น ส่งมายังห้องปฏิบัติการ แล้วเก็บในตู้เย็น สำหรับใช้ในการแยกเชื้อในขั้นตอนต่อไป

2.2. การแยกแอคติโนมัยสีทจากดิน

ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการเจือจางแบบลดลำดับส่วน ครั้งละ 10 เท่า จนได้

ระดับความเจือจาง 10^{-6} ดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Starch Casein Agar (SCA), International Streptomyces Project 1 (ISP1), Actinomyces Isolation agar (AIA) และ Hickey's Terner agar (HTA) [21] จากนั้นเกลี่ยเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Spread plate technique) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของแอคติโนมัยสีท คือ พื้นผิวโคโลนีลักษณะคล้ายหนังสัตว์ ขอบโคโลนีจมลงในอาหาร re-streak เชื้ออีกครั้งบนอาหารสูตร HTA [22] จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็งเอียงสูตร HTA เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.3. การศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์

นำเชื้อบริสุทธิ์ทุกไอโซเลทที่แยกได้ เพาะเลี้ยงบนอาหาร SCA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะโคโลนีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereomicroscope) บันทึกภาพพร้อมรายละเอียดการเจริญของเชื้อ [10]

2.4. การเพาะเชื้อและการศึกษาสภาวะที่ส่งผลต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีท

2.4.1. การเพาะแอคติโนมัยสีทในอาหารเหลว

กระตุ้นแอคติโนมัยสีทโดยการ Streak บนอาหาร SCA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Starch Casein Broth (SCB) ที่ประกอบด้วย แป้ง (Soluble starch) ปริมาณ 3 กรัม โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ปริมาณ 2.0 กรัม เคซีน (Casein) ปริมาณ 2.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต (Mg_2SO_4 $7H_2O$) ปริมาณ 0.3 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ปริมาณ 0.02 กรัม เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$ 7 H_2O) ปริมาณ 0.01 กรัม น้ำกรอง ปริมาตร 1 ลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบวงกลม (Rotary incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ระดับ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนด กรองน้ำเลี้ยงเซลล์ ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ที่ปลอดเชื้อ ตรวจสอบสีของน้ำเลี้ยงเซลล์ด้วยการสังเกตเปรียบเทียบกับแผ่นเทียบเฉดสีมาตรฐานพร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญต่อแบคทีเรียในขั้นตอนต่อไป

2.4.2. การศึกษาสภาวะที่ส่งผลต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีท

การศึกษาระดับอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีท ทำการทดลองโดยการเพาะเชื้อเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.4.1. แต่เปลี่ยนสภาวะการบ่มเป็นระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ 20, 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส การศึกษาชนิดน้ำตาลที่ส่งผลต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีท ทำโดยการเพาะเชื้อเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.4.1. แต่ปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ด้วยการทดแทน Soluble starch เป็นน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แลกโตส (Lactose) กาแลกโตส (Galactose) ฟรุกโตส (Fructose) กลูโคส (Glucose) แมนนิทอล (Mannitol) และซูโครส (Sucrose) การศึกษาชนิดแป้งที่ส่งผลต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีท ทำโดยการเพาะเชื้อเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.4.1. แต่ปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ด้วยการทดแทน Soluble starch เป็นแป้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ แป้งข้าวโพด (Corn flour) แป้งมันฝรั่ง (Potato starch) แป้งมันสำปะหลัง (Casava starch) แป้งข้าวเหนียว (Glutinous rice flour) และแป้งข้าวจ้าว (Rice flour)

2.5. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารชีวภาพจากแอคติโนมัยสีท

2.5.1. การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

กระตุ้นแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *E. coli* TISTR 527, *K. pneumoniae* TISTR 1867, *P. aeruginosa* TISTR 2370, *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* TISTR 746 โดยการ Streak บนอาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop) ถ่ายเชื้อลงในอาหาร Mueller-Hinton broth (MHB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร [23] บ่มบนเครื่องเขย่าแบบวงกลมที่ควบคุมอุณหภูมิระดับ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียโดยนำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่า OD ให้เท่ากับ 0.5 เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

2.5.2. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี Agar block method

ใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อจุ่มในสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรีย ที่ได้จากการเตรียมเซลล์ตามขั้นตอนข้อ 2.5.1. เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร MHA จากนั้นใช้ Cork borer เบอร์ 4 เจาะ แล้วดูดน้ำเลี้ยงเซลล์แอคติโนมัยสีทที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมจานละ 6 หลุม ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) และใช้ Streptomycin เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบวงใสที่เกิดขึ้น [24]

3. ผลการวิจัย

3.1. การแยกแอคติโนมัยสีทจากดิน

ผลจากการแยกแอคติโนมัยสีทจากดินที่เก็บจากอุทยานประวัติศาสตร์พนมรุ้ง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ประกอบด้วย SCA, ISP1, AIA และ HTA สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 123 ไอโซเลท แสดงดัง Table 1

ผลการทดลอง พบว่า ตัวอย่างดินจากตำแหน่งที่ 1 แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้สูงที่สุดจำนวน 31 ไอโซเลท และดินจากตำแหน่งที่ 2 แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้น้อยที่สุด จำนวน 11 ไอโซเลท (Table 1)

3.2. การศึกษาลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้

ผลจากการศึกษาลักษณะโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้ง 123 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ พบว่าลักษณะของโคโลนีมีความหลากหลาย ทั้งทางด้านขนาดโคโลนี ขอบโคโลนี พื้นผิวโคโลนี สีเส้นใยอาหาร สีเส้นใยอากาศ สีสปอร์และความโค้งนูนของโคโลนี แสดงดัง Figure 1 จัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยาได้ 8 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 `โคโลนีมีลักษณะเกาะกันแน่นคล้ายหนังสัตว์ พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นรอยย่น ขอบโคโลนีจมลงในอาหาร โคโลนียึดแน่นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีเป็นสีน้ำตาลจนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีจำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ B1-4, B3-20, B4-1, B5-8, B5-13, B6-1, B6-7, B6-10, B6-13 และ B6-16

กลุ่มที่ 2 พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเป็นผง คล้ายผ้ากำมะหยี่ บริเวณกึ่งกลางโคโลนีมีสีม่วงอ่อน ขอบโคโลนีมีสีขาว มีจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ B1-25, B4-13, B4-20, B6-14, B6-15, B6-19, B6-20 และ B6-21

กลุ่มที่ 3 พื้นผิวโคโลนีเรียบแบนแต่กึ่งกลางโคโลนีจะนูนสูงคล้ายหัวเข็มหมุด โคโลนีมีขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 0.5 เซ็นติเมตร) สีของโคโลนีสีส้มอ่อน ขอบโคโลนีเป็นแบบ Rhizoid มีจำนวน 12 ไอโซเลท ได้แก่ B1-9, B1-10, B1-11, B1-16, B1-17, B1-18, B1-19, B1-26, B1-30, B3-21, B4-8 และ B6-5

กลุ่มที่ 4 พื้นผิวโคโลนีไม่เรียบ ขนาดใหญ่ สีเหลืองถึงเหลืองเข้ม กึ่งกลางโคโลนีมีผงละเอียดสีขาวปกคลุม ความโค้งนูนของโคโลนีสูงมาก ขอบโคโลนีไม่เรียบ มีจำนวน 11 ไอโซเลท คือ B1-20, B1-28, B2-8, B4-11, B4-14, B5-3, B5-5, B5-7, B5-9, B6-4 และ B6-12

กลุ่มที่ 5 พื้นผิวโคโลนีไม่เรียบ มีผงฝุ่นสีขาวปกคลุมหนาแน่นมาก ขอบโคโลนีไม่เรียบ โคโลนีมีทั้งขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.3 ถึง 0.5 เซ็นติเมตร) และขนาดใหญ่ สีน้ำตาล ความโค้งนูนเป็นแบบ Umbonate มีจำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ B1-8, B1-14, B2-1, B2-2, B3-9, B3-10, B3-19, B4-4, B4-5, B5-6, B5-10, B5-11, B5-12, B5-15 และ B6-18

กลุ่มที่ 6 พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะขลุขละ เป็นรอยย่น สีของโคโลนีเป็นสีขาวถึงสีครีม ความโค้งนูนเป็นแบบ Convex โคโลนียึดแน่นกับผิวหน้าอาหาร ขอบโคโลนีจมลงในอาหาร มีจำนวน 17 ไอโซเลท ได้แก่ B1-3, B1-6, B2-3,B2-4, B2-5, B2-6, B2-7, B2-9, B2-10, B3-16, B3-17, B4-3, B4-9, B5-4, B5-14, B6-6 และ B6-17

กลุ่มที่ 7 พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะเรียบคล้ายผ้ากำมะหยี่ บริเวณกึ่งกลางโคโลนีสีจะเข้มกว่าบริเวณขอบ บางไอโซเลทในกลุ่มนี้ กึ่งกลางโคโลนีจะมีสีแดง แต่ขอบโคโลนีเป็นสีขาวถึงขาวครีม ขอบโคโลนีไม่เรียบ สีของโคโลนีมีทั้ง แดงเข้ม ส้ม และส้มแดง มีจำนวน 21 ไอโซเลท ได้แก่ B1-2, B1-16, B1-21, B1-23, B3-5, B3-6, B3-7, B3-8, B3-12, B3-13, B3-14, B3-15, B3-18, B3-22, B4-6, B4-10, B4-12, B4-15, B4-17, B4-18 และ B4-19

กลุ่มที่ 8 พื้นผิวโคโลนีเรียบ แบบ เป็นผง คล้ายผ้ากำมะหยี่ ความโค้งนูนเป็นแบบ Umbonate สีของโคโลนี เป็นสีขาว สีครีม โดยบริเวณกึ่งกลางมีผงสีขาวครีมปกคลุมหนาแน่น โคโลนียึดเกาะกับผิวหน้าอาหารแบบหลวม ๆ ขอบโคโลนีไม่เรียบ มี จำนวน 29 ไอโซเลท ได้แก่ B-1, B1-5, B1-7, B1-12, B1-13, B1-22, B1-24, B1-27, B1-29, B1-31, B2-11, B3-1, B3-2, B3-3, B3-4,B 3-11, B3-23, B3-24, B4-2, B4-7, B4-16, B4-21, B5-1, B5-2, B6-2, B6-3, B6-8, B6-9 และ 6-11

Figure 1 Colony morphology under stereomicroscope of actinomycetes isolated from soil samples of Phanom Rung Historical Park grown on Starch Casein Agar (SCA) incubated at 30°C for 7 days

Table 1 Soil sample collection locations and number of isolated pure cultures

Soil sample collection location	Code of actinomycetes	Number of actinomycetes
Site 1	B1-	31
Site 2	B2-	11
Site 3	B3-	24
Site 4	B4-	21
Site 5	B5-	15
Site 6	B6-	21
	Total	123

3.3. การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารชีวภาพจากแอคติโนมัยสีท

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* TISTR 746, *K. pneumoniae* TISTR 1867, *P. aeruginosa* TISTR 2370, *E. coli* TISTR 527 และ *B. cereus* TISTR 2372 ของแอคติโนมัยสีท 123 ไอโซเลท ดัง Table 2

ผลการทดลอง พบว่าน้ำเลี้ยงเซลล์ของ 115 ไอโซเลทไม่แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบใดใด มี 8 ไอโซเลทที่สามารถต้านการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบได้ มีบางไอโซเลทสามารถต้านการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบได้มากกว่า 1 สายพันธุ์ เช่น B1-2, B1-28, B6-6 และ B6-12 ไม่มีไอโซเลทใดที่ต้านการเจริญต่อ *K. neumoniae* TISTR 1867 และ *P. aeruginosa* TISTR 2370 ทั้งนี้ น้ำเลี้ยงเซลล์จากไอโซเลท B1-28 แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบได้ 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* TISTR 527, *S. aureus* TISTR 746 และ *B. cereus* TISTR 1372 ส่วนน้ำเลี้ยงเซลล์จาก ไอโซเลท B1-2, B6-6 และ B6-12 แสดงฤทธิ์ต้านต่อแบคทีเรียทดสอบได้ 2 สายพันธุ์ คือ *S. aureus* TISTR 746 และ *B. cereus* TISTR 2372 ในขณะที่น้ำเลี้ยงเซลล์จากไอโซเลทที่แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบได้สายพันธุ์เดียว แต่แตกต่างสายพันธุ์กัน ได้แก่ ไอโซเลท B1-27, B2-3, B2-5 (Figure 2) และ B4-13 ที่แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญต่อ *E. coli* TISTR 527, *B. cereus* TISTR 2372, *S. aureus* TISTR 746 และ *B. cereus* TISTR 2372 ตามลำดับ (Table 2)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่ามีแอคติโนมัยสีทร้อยละ 6.51 ของแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่แยกได้ ที่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียและสามารถจัดกลุ่มแอคติโนมัยสีทตามความสามารถในการผลิตสารต้านแบคทีเรีย ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่ผลิตสารต้านแบคทีเรียทดสอบ มีจำนวนมากที่สุด คือ 115 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ผลิตสารต้านแบคทีเรียทดสอบได้ 1, 2, และ 3 สายพันธุ์ ตามลำดับ (Table 3)

ด้านสีของน้ำเลี้ยงเซลล์พบว่ามีความแตกต่างกันไปตามไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าเชื้อผลิตสารชีวภาพที่มีสีแล้วหลั่งออกนอกเซลล์ โดยสีที่พบ เช่น สีน้ำตาล น้ำตาลอ่อน สีเหลือง สีเหลืองอ่อน สีส้ม สีชมพู สีดำ สีม่วง เป็นต้น

จากผลการทดลองดังกล่าว ทีมวิจัยจึงคัดเลือกเชื้อที่ผลิตสารต้านแบคทีเรียทดสอบและเชื้อที่ผลิตและหลั่งสารสีที่แตกต่างกันออกนอกเซลล์ เป็นตัวแทนในการศึกษาสภาวะที่ส่งผลต่อคุณสมบัติของสารชีวภาพ จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลทที่ผลิตและหลั่งสารสี เหลือง ชมพูและน้ำตาล แต่ไม่ผลิตสารต้านแบคทีเรีย ได้แก่ ไอโซเลท B2-2, B3-15 และ B4-17 ไอโซเลทที่ผลิตและหลั่งสารสีน้ำตาลเข้มรวมทั้งแสดงฤทธิ์ต้านต่อแบคทีเรียทดสอบได้ ได้แก่ ไอโซเลท B6-12 (Table 2) เป็นตัวแทนในการศึกษาขั้นต่อไป

Table 2 Antibacterial activity of actinomycetes isolated from soil samples of Phanom Rung Historical Park

Actinomycete isolates	Antibacterial activity against				
	E. coli TISTR 527	*S. aureus* TISTR 746	*K. pneumoniae* TISTR 1867	*P. aeruginosa* TISTR 2370	*B. cereus* TISTR 2372
B1-2	-	++	-	-	+
B1-27	++	-	-	-	-
B1-28	++	++	-	-	++
B2-3	-	-	-	-	+
B2-5	-	+	-	-	-
B4-13	-	-	-	-	+
B6-6	-	++	-	-	++
B6-12	-	++	-	-	+

-: No antimicrobial activity; +: Clear zone 0.01-0.05 mm; ++: Clear zone > 0.05 mm

Table 3 Grouping of actinomycetes isolated from soil sample of Phanom Rung Historical Park according to their ability to produce antibacterial substances

Group	Antibacterial activity	Number of actinomycete isolates
1	No activity	115
2	Inhibited 1 species of bacteria	4 (B1-27, B2-3, B2-5, B4-13)
3	Inhibited 2 species of bacteria	3 (B1-2, B6-6, B6-12)
4	Inhibited 3 species of bacteria	1 (B1-28)

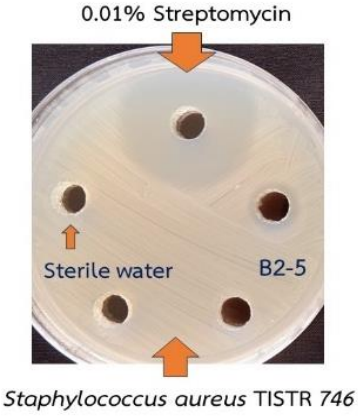

Figure 2 Antibacterial activity of culture filtrate of isolate B2-5 against *S. aureus* TISTR 746

3.4. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีทไอโซเลท

Table 4 แสดงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารชีวภาพ (สารสี และสารต้านแบคทีเรีย) ของแอคติโนมัยสีท

ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารต้านแบคทีเรียของแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่คัดเลือก พบว่า ที่อุณหภูมิ 20, 25, 35 และ 40 องศาเซลเซียส น้ำเลี้ยงเซลล์ของแอคติโนมัยสีททั้ง 4 ไอโซเลท คือ B2-2, B3-15, B4-7 และ B6-12 ไม่สามารถต้านการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ ในขณะที่ เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเฉพาะน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตจากไอโซเลท B6-12 มีฤทธิ์ต้านการเจริญต่อ *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 527 ได้

ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตสารสีของแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่คัดเลือก พบว่า จะแตกต่างกันไปตามระดับอุณหภูมิที่เลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงไอโซเลท B2-2 ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 35 องศาเซลเซียส น้ำเลี้ยงเซลล์จะใสไม่มีสี แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส จะผลิตและหลั่งสารสีเหลือง นอกจากนี้ เมื่อเลี้ยงไอโซเลท B3-15 ที่อุณหภูมิ 20 เชื้อจะผลิตและหลั่งสารสีชมพูอ่อน แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เชื้อจะผลิตและหลั่งสารสีเหลือง ส่วน ไอโซเลท B4-7 พบว่าจะผลิตสารสีได้ 2 สี ที่แตกต่างกัน คือ สีเหลืองและสีน้ำตาล โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตและหลั่งสารสีเหลือง ส่วนที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส เชื้อจะผลิตและหลั่งสารสีน้ำตาล ไอโซเลท B6-12 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส น้ำเลี้ยงเซลล์จะใสไม่มีสี (Clear) ในขณะที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส จะผลิตและหลั่งสารสีโทนเหลือง

3.5. การศึกษาผลของชนิดน้ำตาลต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีท

Table 5 แสดงผลของชนิดน้ำตาลต่อการผลิตสารชีวภาพ (สารสี และสารต้านแบคทีเรีย) ของแอคติโนมัยสีท

ผลของชนิดน้ำตาลต่อการผลิตสารต้านแบคทีเรียของแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่คัดเลือก พบว่า ไอโซเลทที่เดิมไม่ผลิตสารต้านแบคทีเรีย ได้แก่ ไอโซเลท B2-2, B3-15 และ B4-7 ยังคงมีคุณสมบัติคงเดิม คือไม่ผลิตสารต้านแบคทีเรีย ไม่ว่าจะใช้น้ำตาลชนิดใดเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตาม พบว่า ไอโซเลท B6-12 ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ยกเว้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคส แต่เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวก็ไม่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียได้ (Table 5) ซึ่งต่างจากเชื้อไอโซเลท B6-12 ที่เจริญในอาหารที่มี Soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน (อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB) ที่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียได้ (Table 4)

ผลของชนิดน้ำตาลต่อการผลิตสารสีของแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่คัดเลือก พบว่าสารสีที่เชื้อผลิตจะแตกต่างกันและต่างไปจากสีเดิมที่ใช้ Soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน เช่น ไอโซเลท B2-2 เมื่อใช้ Soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน (อาหารเลี้ยงเชื้อ SCB) จะผลิตและหลั่งสารสีเหลือง (Table 4) แต่เมื่อใช้แลกโตส, ฟรุกโตส, กลูโคส, แมนนิทอล, ซูโครส และกาแลกโตส จะผลิตและหลั่งสารสีเหลือง, น้ำตาลเข้ม, น้ำตาล, ใส, น้ำตาลเข้ม และดำ ตามลำดับ (Table 5) ทั้งนี้ความแตกต่างของสีที่ผลิตขึ้นกับชนิดน้ำตาลและไอโซเลทของเชื้อทดสอบ

3.6. การศึกษาผลของชนิดแป้งต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีท

Table 6 แสดงผลของชนิดแป้งต่อการผลิตสารชีวภาพ (สารสี และสารต้านแบคทีเรีย) ของแอคติโนมัยสีท

ผลการทดลอง พบว่าเมื่อทดแทน Soluble starch ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB ด้วยแป้งชนิดอื่น จะทำให้เชื้อบางไอโซเลทไม่สามารถเจริญได้ เช่น ไอโซเลท B2-2 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้างเหนียวเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ไอโซเลท B3-15 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ใช้แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวจ้าวเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และไอโซเลท B6-12 ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนได้

ผลของชนิดแป้งต่อการผลิตสารต้านแบคทีเรียของแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่คัดเลือก พบว่า เมื่อเปลี่ยนแปลงชนิดแป้ง ไอโซเลทที่ไม่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียจะมีคุณสมบัติดังกล่าวเช่นเดิม ยกเว้น กรณีของไอโซเลท B6-12 พบว่าเมื่อใช้ Soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน จะผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *S. aureus* TISTR 746 และ *B. cereus* TISTR 2372 ได้ (Table 4) ในขณะที่ เมื่อใช้แป้งข้าวจ้าวเป็นแหล่งคาร์บอน จะผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *K. pneumoniae* TISTR 1867 (Table 6)

ผลของชนิดแป้งต่อการผลิตสารสีของแอคติโนมัยสีทไอโซเลทที่คัดเลือก พบว่าสารสีที่เชื้อผลิตจะแตกต่างไปจากสีเดิมเมื่อใช้ Soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน (Table 4)

Table 4 Effect of temperature on pigment production and antibacterial activity of the selected actinomycetes isolated from soil samples of Phanom Rung Historical Park

Isolates	Properties	Temperatures (°C)				
		20	25	30	35	40
B2-2	Pigment production	Clear	Clear	Yellow	Clear	Yellow
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
B3-15	Pigment production	Light pink	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
B4-7	Pigment production	Dark yellow	Brown	Yellow	Brown	Yellow
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
B6-12	Pigment production	Clear	Light yellow	Light yellow	Light yellow	Yellow
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Positive (*S. aureus* and *B. cereus*)	Negative	Negative

Table 5 Effect of Carbon sources (Sugars) on pigment production and antibacterial activity of the selected actinomycetes isolated from soil samples of Phanom Rung Historical Park

Isolates	Properties	Carbon sources (Sugars)					
		Lactose	Fructose	Glucose	Mannitol	Sucrose	Galactose
B2-2	Pigment production	Yellow	Dark brown	Dark brown	Clear	Dark brown	Black
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
B3-15	Pigment production	Yellow	Dark brown	Yellow	Yellow	Clear	Light brown
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
B4-7	Pigment production	Light brown	Dark brown	Dark brown	Light yellow	Dark yellow	Brown
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
B6-12	Pigment production	No growth	No growth	Light brown	No growth	No growth	No growth
	Antibacterial activity	No growth	No growth	Negative	No growth	No growth	No growth

Table 6 Effect of Carbon sources (Starches/flours) on pigment production and antibacterial activity of the selected actinomycetes isolated from soil samples of Phanom Rung Historical Park

Isolates	Properties	Carbon sources (Starches/flours)				
		Corn flour	Potato starch	Tapioca starch	Glutinous rice flour	Rice flour
B2-2	Pigment production	Light brown	Light brown	No growth	No growth	Light brown
	Antibacterial activity	Negative	Negative	No growth	No growth	Negative
B3-15	Pigment production	Light brown	Dark yellow	Light black	No growth	No growth
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Negative	No growth	No growth
B4-7	Pigment production	Dark yellow	Cream	Cream	Cream	Cream
	Antibacterial activity	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
B6-12	Pigment production	No growth	Cream	Cream	Dark brown	Dark brown
	Antibacterial activity	No growth	Negative	Negative	Negative	Positive (*K. pneumoniae*)

4. อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยสีทจากดิน โคลน หรือจากพื้นที่อดีตเคยเป็นภูเขาไฟ [8], [9] หรือแม้แต่การศึกษาความหลากหลายของเชื้อจากแหล่งนิเวศอื่น [18]-[21] มักสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ไอโซเลทจำนวนมาก ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้ ที่แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้เพียง 123 ไอโซเลท อาจเนื่องมาจากลักษณะของระบบนิเวศบริเวณอุทยานประวัติศาสตร์พนมรุ้งตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดินมาศึกษานั้นเป็นบริเวณที่มีเพียงหญ้าเจริญอยู่ทั่วไป ลักษณะดินเป็นดินร่วนปนทราย ค่า pH ของดินค่อนข้างเป็นกรด (pH ระหว่าง 5.20-5.80) ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีท [7], [16] อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อที่แยกได้ มีความหลากหลายสูงในด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่จัดออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้ถึง 8 กลุ่ม จากงานวิจัยนี้พบความโดดเด่นของลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้ด้านสีโคโลนี เช่น แดง ส้มและม่วง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยความหลากหลายของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินในเคอร์ดีสถาน อิรัก (Kurdistan Region-Iraq) [25] ที่พบเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มีสีต่าง ๆ ได้แก่ ขาวครีม เทา น้ำตาลเข้ม ทั้งนี้โทนสีที่พบแตกต่างกันเนื่องจากรายงานวิจัยดังกล่าวใช้อาหารสูตร ISP1 แต่งานวิจัยนี้ใช้อาหารสูตร SCA จึงส่งผลให้เชื้อเจริญและแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เพราะเชื้อจุลินทรีย์ใช้กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ที่แตกต่างกันเพื่อใช้ในการเจริญ ส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแตกต่างกันด้วย ด้านลักษณะพื้นผิวโคโลนีของเชื้อที่แยกได้พบว่าความสอดคล้องกับ งานวิจัยของ Intra et al. [26] ที่พื้นผิวโคโลนีมีลักษณะคล้ายหนังสัตว์และมีสีที่โดดเด่น เช่น สีแดง และยังสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีทจากดิน จังหวัดกำแพงเพชร [10]

จากการคัดกรองเบื้องต้น พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ 123 ไอโซเลท มีไอโซเลทที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญต่อแบคทีเรียเพียง 8 ไอโซเลท อาจเนื่องมาจากวิธีการที่ใช้ในการเตรียมสารชีวภาพ เพราะในงานวิจัยนี้ใช้น้ำเลี้ยงเซลล์ในการทดสอบ ซึ่งแตกต่างจากรายงานวิจัยอื่นที่ใช้เทคนิคการสกัดสารออกจากเซลล์ [18]-[21] แสดงให้เห็นว่าเชื้อแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากงานวิจัยนี้ ผลิตสารเมแทบอไลต์ (Metabolite) แล้วปลดปล่อยสารนั้นออกนอกเซลล์ จึงเป็นเชื้อที่มีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้งาน เพราะขั้นตอนในการเตรียมสารชีวภาพไม่ยุ่งยาก ลดขั้นตอนในการสกัดสารออกจากเซลล์ ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายต่าง ๆ ที่ต้องใช้ในขั้นตอนการสกัดสารออกจากเซลล์ เชื้อบางไอโซเลท เช่น B1-28 พบว่าผลิตและหลั่งสารชีวภาพที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียได้ถึง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* TISTR 527, *B. cereus* TISTR 2372 และ *S. aureus* TISTR 746 หากมีการศึกษาเพิ่มเติมอาจพัฒนาสารชีวภาพจากเชื้อนี้เพื่อใช้เป็นสารปฏิชีวนะชนิด Broad spectrum ได้ เพราะสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนไอโซเลท B1-2, B6-6 และ B6-12 ผลิตสารต้านแบคทีเรียทดสอบได้ 2 สายพันธุ์ เป็นพวกแกรมบวก ดังนั้นอาจพัฒนาไปเป็นสารปฏิชีวนะกลุ่ม Narrow spectrum ได้ และจากผลการทดลองเมื่อทดแทน Soluble starch ด้วยแป้งข้าวจ้าว ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SCB จะทำให้เชื้อไอโซเลท B6-12 ผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญต่อ *K. pneumoniae* TISTR 1867 ได้ นับว่าเป็นข้อมูลที่น่าสนใจในการศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาให้เป็นยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ เนื่องจากมีรายงานการดื้อต่อยาเซฟาโลสปอริน และเพนนิซิลลิน ซึ่งเป็นยาที่ปัจจุบันใช้ในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อนี้

การศึกษาสภาวะบางประการที่ส่งผลต่อการผลิตสารชีวภาพของแอคติโนมัยสีท พบว่า ด้านสารสี ปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ชนิดน้ำตาล และชนิดแป้ง โดยพบว่า ไอโซเลทเดียวกันหากเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน แต่ใช้ระดับอุณหภูมิในการบ่มแตกต่างกัน เชื้อจะผลิตสารสีที่แตกต่างไปจากเดิม ทำนองเดียวกับ ชนิดน้ำตาลและชนิดแป้ง พบว่าส่งผลต่อสารสีที่เชื้อผลิตเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pattanapipitpaisal et al. [27] ที่พบว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิตสารสีของแอคติโนมัยสีท และมีรายงานวิจัยที่สนับสนุนว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนส่งผลต่อการผลิตสารสีของแอคติโนมัยสีท [28] กรณีที่น่าสนใจในงานวิจัยนี้ คือ ไอโซเลท B2-2 เมื่อใช้แลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะผลิตและหลั่งสารสีดำ นับว่าเป็นสารสีที่น่าสนใจที่ควรศึกษาเพิ่มเติม และหาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตเพื่อการประยุกต์ใช้เป็นสีธรรมชาติ สำหรับใช้งานในอุตสาหกรรมหมึกพิมพ์ อุตสาหกรรมสีย้อม ที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมได้ในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อ 3 ไอโซเลท คือ B2-2, B3-15 และ B4-17 ยังคงคุณสมบัติเดิมคือไม่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรีย แม้ว่าจะมีการปรับเปลี่ยนสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง แสดงว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท อาจไม่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารดังกล่าว ส่วนไอโซเลท B6-12 พบว่า ไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเพิ่มจำนวนได้ ยกเว้นน้ำตาลกลูโคส

แต่เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนก็ไม่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรีย เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่ากลูโคสอาจมีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารต้านแบคทีเรียของไอโซเลทนี้

กรณีศึกษาการใช้แป้งที่มีจำหน่ายในท้องตลาดทดแทน Soluble starch พบว่า ไอโซเลทที่ไม่ผลิตสารต้านแบคทีเรีย จะยังคงมีคุณสมบัติเช่นเดิมไม่ว่าจะใช้แป้งชนิดใดทดแทน Soluble starch อย่างไรก็ตาม สำหรับไอโซเลท B6-12 พบว่าชนิดแป้งทำให้ความสามารถในการผลิตสารต้านแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่พบว่าปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตสารต้านจุลชีพของแอคติโนมัยสีทคือ แหล่งคาร์บอน [29] รวมทั้งมีรายงานวิจัยที่สนับสนุนว่ากระบวนการผลิตสารปฏิชีวนะของเชื้อในกลุ่ม Streptomyces ถูกยับยั้งหรือกดการแสดงออกเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลกลูโคส แอมโมเนีย และฟอสเฟต [30]

จากข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ นับได้ว่าเป็นแนวทางที่มีประโยชน์ในเชิงการพัฒนาต่อยอดด้านการประยุกต์ใช้เชื้อในกลุ่มแอคติโนมัยสีทเพื่อผลิตสารชีวภาพต่าง ๆ ทั้งสารปฏิชีวนะและสารสี การปรับสภาวะต่าง ๆ ในการเลี้ยงเชื้อ เช่น อุณหภูมิ ชนิดแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลต่อความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะและสารสี นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับเปลี่ยนชนิดของแป้งยังส่งผลชนิดของสารต้านแบคทีเรียที่ไอโซเลท B6-12 ผลิตขึ้น นับว่ามีคุณสมบัติเบื้องต้นที่น่าสนใจที่อาจนำไปสู่การเป็นสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ แต่ยังต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมทางด้านชีวเคมีและโครงสร้างของสาร รวมทั้งการทดสอบฤทธิ์ของสารชีวภาพนี้กับแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์อื่นเพิ่มเติม รวมทั้งสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ และควรศึกษาความปลอดภัยและผลข้างเคียงของสารก่อนที่จะนำมาประยุกต์ใช้

5. บทสรุป

ความหลากหลายทางชีวภาพของแอคติโนมัยสีทที่แยกจากตัวอย่างดินจากอุทยานประวัติศาสตร์พนมรุ้ง จังหวัดบุรีรัมย์ แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 123 ไอโซเลท พบว่ามีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา จัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี เมื่อเลี้ยงบนอาหาร SCA ได้ 8 กลุ่ม และจัดกลุ่มตามความสามารถในการผลิตและหลั่งสารต้านแบคทีเรีย ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่ผลิตสารต้านแบคทีเรียทดสอบ มีจำนวนมากที่สุด คือ 115 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 ผลิตสารต้านแบคทีเรียทดสอบได้ 1, 2 และ 3 สายพันธุ์ ตามลำดับ โดยมีแอคติโนมัยสีท ร้อยละ 6.51 ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้ทั้งหมดที่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียได้ ส่วนปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการผลิตสารชีวภาพ (สารสี และสารต้านแบคทีเรีย) ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และแหล่งคาร์บอน (ชนิดน้ำตาลและชนิดแป้ง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ที่อำนวยความสะดวกด้านการบริหารจัดการงบประมาณและการให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

7. References

[1] Donald, L. and et al. 2022. *Streptomyces*: Still the Biggest Producer of New Natural Secondary Metabolites, a Current Perspective. **Microbiology Research.** 13: 418-465.

[2] Alam, K. and et al. 2022. Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. **Frontiers in Microbiology.** 13: 968053.

[3] Hassan, O., Khalil, M.S. and Elnawawy, A.S. 2022. Biodegradation of agricultural wastes by cellulase producing bacteria. **International Journal of Innovative Science, Engineering and Technology.** 9(1): 2348-7968.

[4] Javed, Z. and et al. 2021. Actinomycetes-The microbial machinery for the organic-cycling, plant growth, and sustainable soil health. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.** 31: 101893.

[5] Alghamdi, A.M.A. and et al. 2021. Evaluating desert actinomycetes for enzyme and antibacterial production. **Journal of Pure and Applied Microbiology.** 15(2): 076-982.

[6] Risdian, C. and et al. 2021. *Streptomyces bathyalis* sp. Nov., an actinobacterium isolated from the sponge in a deep sea. **Antonie wan Leeuwenhoek.** 114: 425-435.

[7] Sriyapai, T. and et al. 2015. Biological potentials of actinomycetes isolated from mangrove soil in Satun Province. **Thai Journal Forest.** 34(2): 51-61. (*in Thai*)

[8] Cheeptham, N. and et al. 2013. Cure from the cave: Volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. **International Journal of Speleology.** 42(1): 35-47.

[9] Srinivas, T.N.R. and et al. 2011. *Cesiribacter andamanensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a soil sample from a mud volcano. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 61: 1521-1527.

[10] Maruekarajtinplaeng, S. 2017. Isolation and study in some characters of actinobacteria from archeological site in Kamphaeng Phet Historical Park attributed to biodeteriolation. **Srinakharinwirot University Journal of Science and Technology.** 33(2): 51-69. (*in Thai*)

[11] Woodruff, HB. 2014. Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. **Applied and Environmental Microbiology.** 80(1): 2-8.

[12] Jensen, P.R., Dwight, R. and Fenical, W. 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology.** 57: 1102-1108.

[13] Hassan, A.A. and et al. 2011. Evaluation of biological compounds of *Streptomyces* species for control of some fungal diseases. **The Journal of American Science.** 7: 752-760.

[14] Chaudhary, H.S. and et al. 2013. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production. **Journal of Applied Pharmaceutical Science.** 3(8): 83-94.

[15] Jiang, Z. and et al. 2015. Xiakemycin A, a novel pyranonaphthoquinone antibiotic, produced by the *Streptomyces* sp. CC8-201 from the soil of a karst cave. **The Journal of Antibiotics.** 68: 771-994.

[16] Nakaew, N., Pathom-aree, W. and Lumyong, S. 2009. Genetic diversity of rare actinomycetes from Thai cave and their possible use as new bioactive compounds. **Actinomycetologica.** 23(2): 21-26.

[17] Indrawattana, N. and Vanaporn, M. 2015. Nosocomial infection. **Journal of Medicine and Health Sciences.** 22(1): 81-92. (*in Thai*)

[18] Chanthasena, P. and et al. 2022. Isolation and identification of bioactive compounds from *Streptomyces actinomycinicus* PJ85 and their in vitro antimicrobial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics.** 11(12): 1797.

[19] Chanama, M., Suriyachadkun, C. and Chanama, S. 2023. *Streptomyces antimicrobicus* sp. nov., a novel clay soil-derived actinobacterium producing antimicrobials against drug-resistant bacteria. **PLoS One.** 18(5): e0286365.

[20] Chakraborty, I. and et al. 2015. Isolation and characterization of pigment producing marine actinobacteria from mangrove soil and applications of bio-pigments. **Der Pharmacia Lettre.** 7(4): 93-100.

[21] Jeffrey, L.H. 2008. Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soil at Semongok, Sarawak. **African Journal of Biotechnology.** 7(20): 3697-3702.

[22] Abdulla, H. and et al. 2008. Characterization of actinomycetes isolation from ancient stone and their potential for deterioration**. Polish Journal of Microbiology.** 57(3): 213-220.

[23] Niyomvong, N. 2001. Broad-spectrum antimicrobial compound from *Streptomyces coerulescens* NN91. **Journal of Agriculture.** 37(3): 305-351. (*in Thai*)

[24] Al Farraj, D.A. and et al. 2019. Antibiotics production in optimized culture condition using low cost substrates from *Streptomyces* sp. AS4 isolated from mangrove soil sediment. **Science Journal of King Saud University.** 32: 1528-1535.

[25] Jalal, B.K. and Hasan, A.H. 2020. Molecular and phenotypic characterization of novel *Streptomyces* species isolated from Kurdistan soil and its antibacterial activity against human pathogens. **Jordan Journal of Biological Sciences.** 14(3): 441-451.

[26] Intra, B. and et al. 2011. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. **BMC Research Notes.** 4: 98.

[27] Pattanapipitpaisal, P., Promla, P. and Srichantha, S. 2019. Melanin production and antibacterial activity by melanin produced by actinomycetes strain PNST-01 and PRBS-12. **RMUTP Research Journal: Science & Technology.** 13(20): 142-155. (*in Thai*)

[28] Palanichamy, V. and et al. 2011. Optimization of cultivation parameters for growth and Pigment Production by *Streptomyces* spp. Isolated from Marine sediment and Rhizosphere soil. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Science.** 1(3): 158-170.

[29] da Silva, I.R. and et al. 2012. The effect of varying culture conditions on the production of antibiotics by *Streptomyces* spp., isolated from the Amazonian soil. **Fermentation Technology.** 1(3): 1000105.

[30] Chandrakar, S. and Gupta, A.K. 2019. Actinomycin-producing endophytic *Streptomyces parvulus* associated with root of aloe vera and optimization of conditions for antibiotic production. **Probiotics and Antimicrobial Proteins.** 11: 1055-1069.